

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2004-236516
 (43)Date of publication of application : 26.08.2004

(51)Int.Cl. A01H 1/02

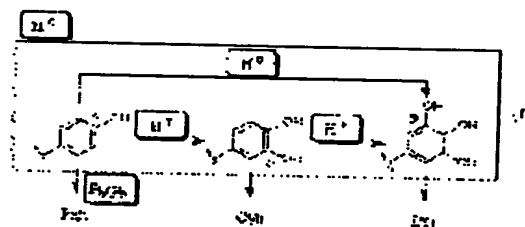
(21)Application number : 2003-026598 (71)Applicant : HASHIMOTO FUMIO
 SAKATA YUSUKE
 (22)Date of filing : 04.02.2003 (72)Inventor : HASHIMOTO FUMIO
 SAKATA YUSUKE

(54) METHOD FOR FLOWER COLOR GENOTYPE CROSSING OF EUSTOMA OR LISIANTHUS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To elucidate inheritance of flower pigment biosynthesis and elucidate the flower color inheritance and pigment genotype of Eustoma or Lisianthus, and further to provide a practical method for genotype crossing for creating a new flower color of petals including the Eustoma or Lisianthus.

SOLUTION: This method for flower color genotype crossing comprises the following. A new law that the flower color genotype is involved in flavonoid biosynthesis of a pathway formula (I) and inheritance of flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) or flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3',5'H) is controlled with four multiple alleles is found out. From the results, the flower color can freely be created from the pigment genotype of the Eustoma or Lisianthus even without using a method for causing mutation by genetic recombination, irradiation, or the like. Thereby, the new flower color can be created.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 12.11.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

* NOTICES *

JPO and NCIPJ are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

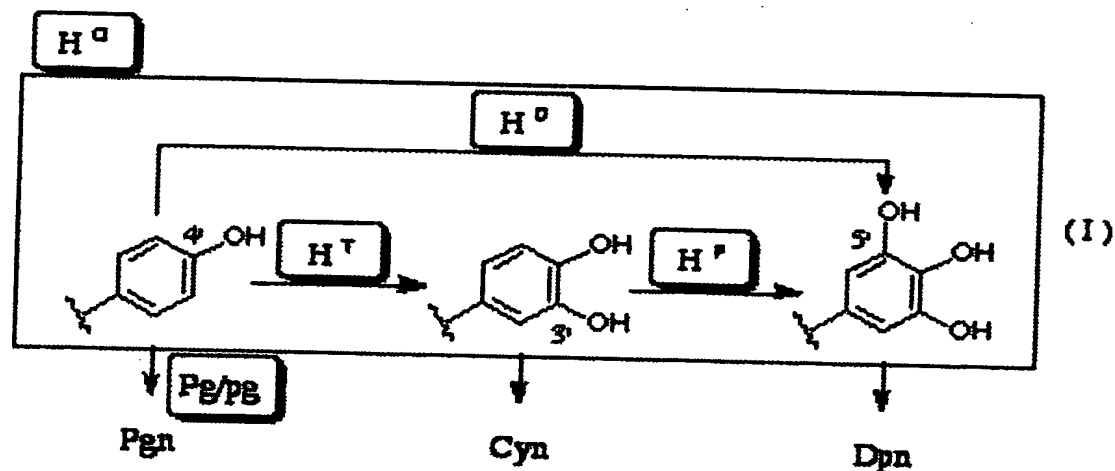
[Claim 1]

The flower color genotype cross-over design which is heredity of the pelargonidin (Pgn) of the main anthocyanidin coloring matter in connection with the flower color manifestation of a flowering plant, cyanidin (Cyn), and delphinidin (Dpn), and creates a new flower color using genotype HXHX-Pg/pg.

[Claim 2]

The flower color genotype cross-over design according to claim 1 which a flower color genotype participates in the flavonoid biosynthesis of a path expression (I), and is hereditary.

[Formula 1]



(Here, HT, HF, HD, and HO express the multiple alleles about hydroxylation of B ring in the precursor of a flavonoid biosynthesis.) four multiple alleles, HT, HF, HD, and HO, — flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H), flavonoid 3', 5'-hydroxylase (F3', 5'H) — respectively — 3' — hydroxylation of an about, and 5 — 'hydroxylation of an about, 3', and 5 — about 'hydroxylation of an about, and 3' — 3' and 5' — hydroxylation of an about is controlled. Other notations, such as T, F, D, and O, are sufficient as the notation approach of these four multiple alleles. Pg/pg shows that the locus which is opposed to the manifestation of the dihydroflavonol reductase (DFR) which participates in the biosynthesis of Pgn, or anthocyanidin synthase (LDOX or AS) exists.

[Claim 3]

The flower color genotype cross-over design according to claim 1 or 2 from which the flower color of a flowering plant is inherited in a flavonoid biosynthesis process.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[The technical field to which invention belongs]

This invention relates to the new flower color breeding method of *Eustoma russellianum* (*Eustoma* or *Lisianthus*) which applied the flower color genotype. Furthermore, it is related with the new flower color breeding method of the flowering plant which applied the flower color genotype.

[0002]

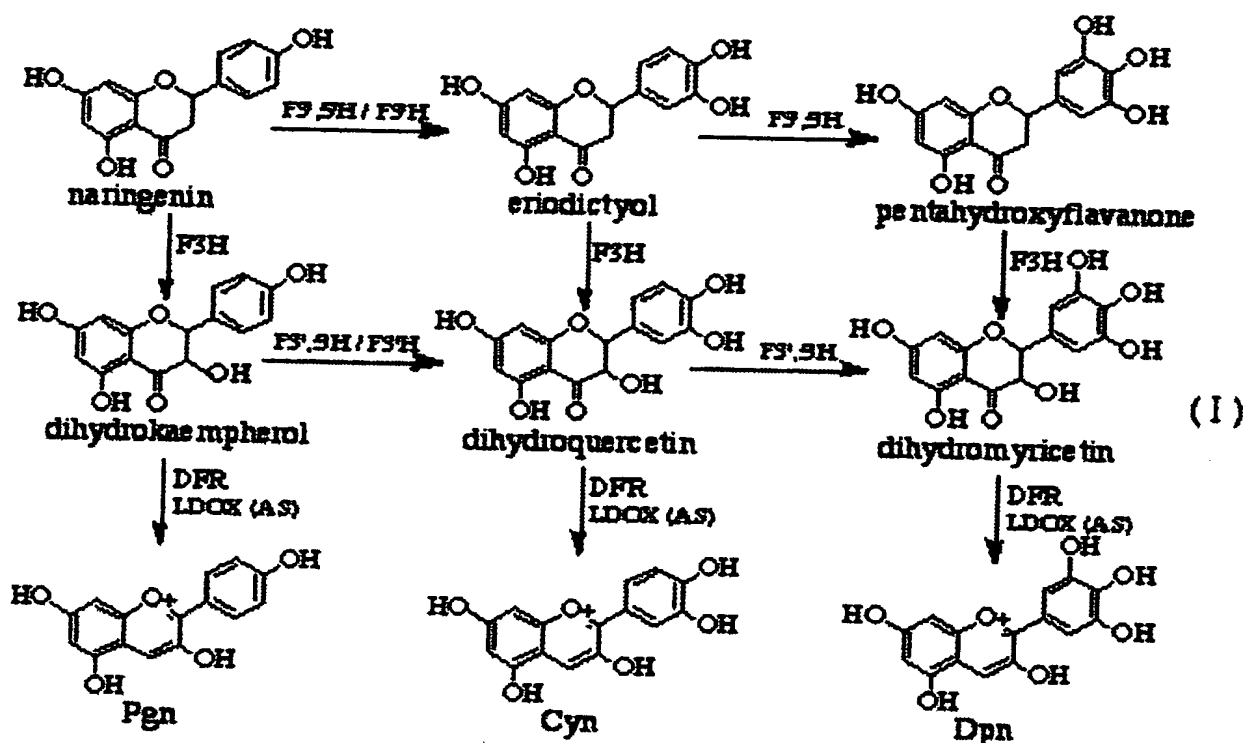
[Description of the Prior Art]

It is a kind of a flavonoid compound, and anthocyanins exist in a vegetable flower, fruits, a leaf, etc. widely, and it is a coloring matter glycoside related to coloration, such as red, purple, and blue. It will be decomposed into the anthocyanidin which are a sugar part and the aglycon section if anthocyanins are hydrolyzed with a hydrochloric acid (nonpatent literature 1, the structure of a Takao Murakami:natural product and chemistry, Hirokawa Publishing, September, 1984: 170-172).

[0003]

In a vegetable flower, the biosynthesis of the anthocyanidins is carried out considering the naringenin (naringenin) which is a flavanone as starting material. That is, it is known that enzymatic conversion will be carried out to ERIDIKUCHIO-RU (eriodictyol) which one more hydroxyl group combined with B ring of a flavanone frame first according to an operation of flavonoid 3'-hydroxylase (F3', 5'H, or F3'H), and the PENTAHAIOROKISHI flavanone (pentahydroxyflavanone) combined two more pieces. Moreover, the naringenin which is starting material receives an operation of flavonoid 3-hydroxylase (F3H), enzymatic conversion is carried out to dihydrokaempferol (dihydrokaempferol), this serves as a substrate, an operation of flavonoid 3'-hydroxylase is received further, and it is known that enzymatic conversion will be carried out to the dihydroquercetin (dihydroquercetin) which one more hydroxyl group combined with B ring, and the dihydromyricetin (dihydromyricetin) combined two more pieces. It is known that the enzymatic conversion of three sorts of these dihydroflavonols (dihydrokaempferol, dihydroquercetin, dihydromyricetin) will be carried out to a pelargonidin (Pgn), cyanidin (Cyn), and delphinidin (Dpn) in response to an operation of dihydroflavonol reductase (DFR) and anthocyanidin synthase (LDOX or AS), respectively (nonpatent literature 2, the structure of a Takao Murakami:natural product and chemistry, Hirokawa Publishing, September, 1984: 155-185). A general path expression (I) shows this general biosynthetic path.

[Formula 2]



[0004]

As for anthocyanidins, the coloration is determined because the hydroxyl groups of B ring differ. For example, what generally has one hydroxyl group at least in 4' of B ring among the chemical structure with flower coloring matter presents orange - vermilion red by the pelargonidin (Pgn). 3' of B ring and the thing which has two hydroxyl groups at least in 4' present red - crimson by cyanidin (Cyn). B - a ring - three - ' - four - ' - five - ' - about - a hydroxyl group - three - a piece - it is - a thing - delphinidin (Dpn) - purplish red - a color - purple - presenting - these - living together - things - various flower colors - being discovered (nonpatent literature 3, :modernization study besides Toshio Honda, May, 1998: 25-32).

[0005]

Many anthocyanins which various acyl groups besides these combined are reported. The phenomenon in which these carry out a stacking mutually between molecules and which a flower color modulates (intermolecular self-association operation), The phenomenon which carries out a stacking to other the shape of yellow flavonoids and sandwiches and which a flower color modulates (blue-izing) (intermolecular KOPIGUMENTO operation), The phenomenon which a flower color modulates by combining with a metal atom (blue-izing) (metal complex ion formation operation), The phenomenon in which the acyl group in a molecule etc. carries out a stacking by intramolecular and which a flower color modulates (blue-izing) (intramolecular KOPIGUMENTO operation), It is admitted that a flower color is determined by the phenomenon in which the inside pH of a cell vacuole changes to a list etc. (33 nonpatent literature 4, Goto, T. et al.:Angew.Chem.Int.Ed.Engl., 30:17- 1991).

[0006]

Many things to which vegetable flower color heredity regarded the flower color (red, blue, yellow, purple, etc.) itself as genotype are reported (nonpatent literature 5, Yasuda **: the physiology and biochemistry of a flower color, Uchida Rokakuho Publishing:pp 219-272). Although the analysis of the flower color genotype about flavonoid coloring matter is tried in recent years, these are based on the 1 gene 1 enzyme theory which Biel (Beale, 1945) advanced. As the example, it writes E1/e1 and E2/e2 [the enzyme system of the dihydroflavonol reductase (DFR) in the anthocyanidin biosynthesis of a geranium petal and anthocyanidin synthase (LDOX or

AS)], respectively, and there is an approach supposing genotype (176 nonpatent literature 6, Kana Kobayashi: a thremmatology magazine, 48:169- 1998).

[0007]

Moreover, it is reported by the flower of a petunia that two genes of Ht1 and Ht2 control flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H), and two genes of Hf1 and Hf2 control flavonoid 3' and 5'-hydroxylase (F3', 5'H) (1083 T. nonpatent literature 7, Holton, A.et al.:The Plant Cell, 7:1071-1995).

[0008]

Furthermore, with the flower of a petunia, there is a publication that hydroxylation of B ring of flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H), flavonoid 3', 5'-hydroxylase (F3', 5'H) has received 2 gene rule (nonpatent literature 8, Holton, T.A.et al.:Nature, 366:276-279). At the flower color genotype cross-over design by this invention, that the flower color is controlled by four multiple alleles under rule of one gene was not able to identify flower color coloring matter heredity of Eustoma russellianum as 2 gene rule in the description.

[0009]

Furthermore, by the flower of a petunia, each two locus (Ht1 and Ht2 participate in the hydroxylation like 3' of a flavonoid B ring) on gene level again Although Hf1 and Hf2 clarified the fact of involving at the hydroxylation like 5' of a flavonoid B ring There are troubles — what kind of flower color is inherited to progeny as a coloring matter genotype and functionality was not necessarily accepted in heredity of a coloring matter genotype and a flower color — (245 nonpatent literature 9, Griesbach, R.J.:J.Heredit., 87:241- 1996).

[0010]

In addition, JP,5-184370,A (henceforth the patent reference 1) has the publication of a flavonoid hydroxylase gene (the 0001-0002nd paragraphs of the patent reference 1). "The fragment of the DNA strand which is carrying out the code of flavonoid 3' and the protein with 5'-hydroxylase activity, or the arbitration of this DNA strand is offered. A form with new color can be created by introducing this DNA strand into the purpose vegetation. There is a publication that moreover, this invention relates also to the recombination vector containing the fragment of the above-mentioned DNA strand or the arbitration of this DNA strand" (the 0004th paragraph of the patent reference 1). JP,10-113184,A (henceforth the patent reference 2) has the publication of a flavonoid ***** gene (the 0001-0008th paragraphs of the patent reference 2). the petal of "gentian — UDP-glucose: — isolating flavonoid 3 and a 5-O-glucosyltransferase gene and carrying out the sequencing — succeeding — " — there is a publication of "being in offering the glycosyltransferase gene which may ***** the 2nd place, the 3rd place and the 5th place, among gene thio delphin biosynthesis genes" (the 0005th paragraph of the patent reference 2). JP,11-509733,A (henceforth the patent reference 3) has the publication of the claims 1-15 about the constituent and approach for the gene expression accommodation in vegetation.

[0011]

[Patent reference 1]

JP,5-184370,A (the 2nd page, the 14th page, drawing 2)

[Patent reference 2]

JP,10-113184,A (the 2nd page)

[Patent reference 3]

JP,11-509733,A (the 2nd page)

[Nonpatent literature 1]

Takao Murakami, an "anthocyanin derivative", the structure of a natural product and chemistry, Hirokawa Publishing, September, 1984, P.170-172.

[Nonpatent literature 2]

Takao Murakami, "flavonoid", the structure of a natural product and chemistry, Hirokawa Publishing, September, 1984, P.155-185.

[Nonpatent literature 3]

Toshio Honda, Norio Saito, "the science of the color of a flower", modernization study, Tokyo Kagaku Dojin, May, 1998, P.25-32.

[Nonpatent literature 4]

Goto, T., Kondo, T., "Structure and Molecular Stacking of Anthocyanins- Flower Color Variation" and Angew.Chem.Int.Ed.Engl., 1991, the 30th volume, P.17-33.

[Nonpatent literature 5]

Yasuda **, "the chemical genetics of a flower color", the physiology and biochemistry of a flower color, Uchida Rokakuho Publishing, March, 1993, P.219-272.

[Nonpatent literature 6]

Kana Kobayashi, other binary names, "a purple elucidation of the heredity format for flower creation in a geranium", a thremmatology magazine, 1998, the 48th volume, P.169-176.

[Nonpatent literature 7]

Holton, T.A., Cornish and E.C., "Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis", The Plant Cell, 1995, the 7th volume, P.1071-1083.

[Nonpatent literature 8]

"Cloning and Expression of Cytochrome P450 Genes Controlling Flower Colour" besides [nine] Holton and T.A., Nature, 1993, the 366th volume, P.276-279.

[Nonpatent literature 9]

Griesbach, R.J., "The Inheritance of Flower Color in *Petunia hybrida* Vilm", J.Heredit., 1996, the 87th volume, P.241-245.

[0012]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]

however, by the genotype breeding method of the flower color itself, it left many [separation of a progeny flower color has many ambiguous places, and] troubles for putting in practical use. Moreover, about heredity of the geranium flower coloring matter which has a publication in nonpatent literature 6 and which was expressed with E1/e1 and E2/e2, a point in question is in the segregation ratio of progeny, and it did not result in utilization, either. In patent reference, if mutation by transgenics, exposure, etc. is not made to start, there is a problem that a new flower color cannot be created.

[0013]

This invention offers a practical genotype cross-over design about new flower color creation of the flowering plant which makes *Eustoma russellianum* the start, after clarifying heredity of flower color history composition and clarifying flower color heredity and the coloring matter genotype of *Eustoma russellianum*.

[0014]

[Means for Solving the Problem]

flavonoid 3 concerning hydroxylation of B ring of a flavonoid biosynthesis in order that this invention persons may solve the above-mentioned technical problem — '— hydroxylase (F3'H) and flavonoid 3' — Its attention is paid to heredity of 5'-hydroxylase (F3', 5'H) etc. It combines with heredity of the enzyme system of the dihydroflavonol reductase (DFR) which participates in a pelargonidin biosynthesis, and anthocyanidin synthase (LDOX or AS) being controlled by dominant [of Pg/pg] / recessive gene, as a result of investigating separation of the heredity. The new principle that heredity of flavonoid 3 '— hydroxylase (F3'H), flavonoid 3', 5'-hydroxylase (F3', 5'H) is controlled by four multiple alleles as a header and a result Even if it does not use the approach of making the mutation by transgenics, exposure, etc. starting, the creation of the flower color can be freely carried out from the coloring matter genotype of *Eustoma russellianum*. namely

[0015]

Three anthocyanidins whose this inventions are main flower coloring matter of *Eustoma russellianum*: As a result of inquiring by performing inbreeding and reciprocal crossings paying attention to heredity of a pelargonidin (Pgn), cyanidin (Cyn), and delphinidin (Dpn), a hereditary new principle was found out from separation of F1-F3 generation coloring matter phenotype. Moreover, it found out being inherited by Pgn and Dpn coloring matter not living together, but both being accepted as an independent mold about Pgn and a Dpn coloring matter mold, respectively, or being accompanied by Cyn coloring matter. it found out that the locus shown as Pg/pg on the anthocyanidin biosynthesis level in a flavonoid biosynthesis existed in heredity of Pgn coloring matter as a result of separation of a progeny seedling, and a chi square test.

Moreover, flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) and flavonoid 3' which participate in hydroxylation of B ring of a coloring matter precursor. In the enzyme reaction system of 5'-hydroxylase (F3', 5'H) Four multiple alleles, HT, HF, HD, and HO, existed, these controlled the hydroxylation like 3', the hydroxylation like 5' hydroxylation of an about, 3', 5', and the hydroxylation like 3' grade, 3', 5', and a header and this invention were completed for flower color phenotype being determined with these combination.

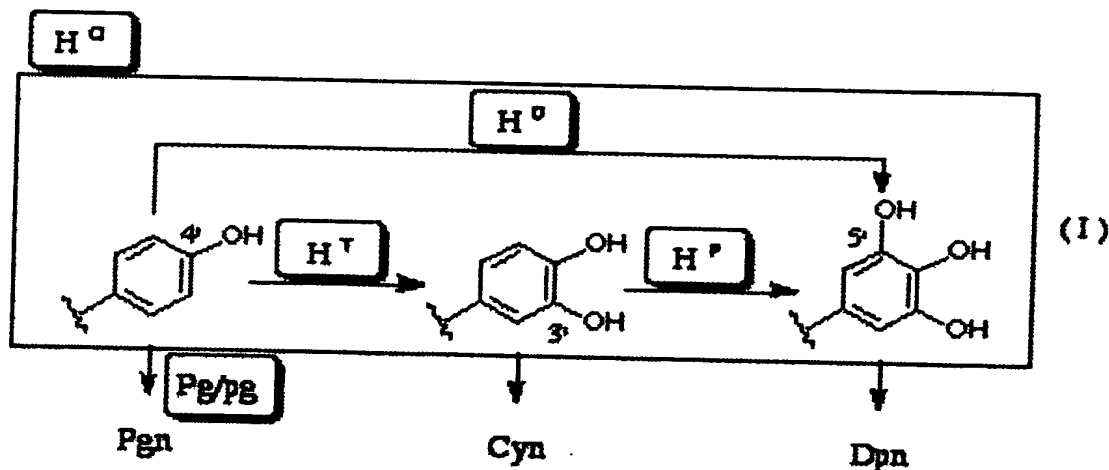
[0016]

The flower color genotype cross-over design of this invention is heredity of the pelargonidin (Pgn) of the main anthocyanidin coloring matter in connection with the flower color manifestation of a flowering plant, cyanidin (Cyn), and delphinidin (Dpn), and creates a new flower color using genotype HXHX-Pg/pg. For example, the pelargonidin of the main anthocyanidin coloring matter in connection with the flower color manifestation of the *Eustoma russellianum* petal (Pgn), About heredity of cyanidin (Cyn) and delphinidin (Dpn) the flavonoid 3 which shows the locus of Pgn coloring matter as Pg/pg, and participates in hydroxylation of B ring of a flavonoid coloring matter precursor — ' — hydroxylase (F3'H) and flavonoid 3' — The genotype of the enzyme reaction system of 5'-hydroxylase (F3', 5'H) Four multiple alleles, HT, HF, HD, and HO, show, and two of the notations of Pg/pg are chosen (it PgPg(s)). One of the match-marking of Ppgp and ppgp is chosen. Moreover, HT, Two of the notations of HF, HD, and HO are chosen (it HTHT(s), HTHF(s) and HTHD(s)). It is the flower color genotype cross-over design which carries out the breeding of the new flower color which chose one of the match-marking of HTHO, HFHF, HDHF, HOHF, HDHD, HDHO, and HOHO, and used the approach of being genotype HXHX-Pg/pg.

[0017]

As for the flower color genotype cross-over design of this invention, that from which a flower color genotype participates in the flavonoid biosynthesis of a path expression (I), and is inherited is also contained.

[Formula 3]



Here, HT, HF, HD, and HO express the multiple alleles about hydroxylation of B ring in the precursor of a flavonoid biosynthesis. four multiple alleles, HT, HF, HD, and HO, — flavonoid 3' — hydroxylase (F3'H), flavonoid 3', 5'-hydroxylase (F3', 5'H) — respectively — 3' — hydroxylation of an about, and 5 — 'hydroxylation of an about, 3', and 5 — about 'hydroxylation of an about, and 3' — 3' and 5' — hydroxylation of an about is controlled. Other notations, such as T, F, D, and O, are sufficient as the notation approach of these four multiple alleles. Pg/pg shows that the locus which is opposed to the manifestation of the dihydroflavonol reductase (DFR) which participates in the biosynthesis of Pgn, or anthocyanidin synthase (LDOX or AS) exists.

[0018]

The flower color of a flowering plant can apply the flower color genotype cross-over design of this invention to what is hereditary in a flavonoid biosynthesis process.

[0019]

The flowering plant of this invention is anthophyta which has a flower containing flavonoid, and it is related with a dicotyledonous plant and a monocotyledonous plant as anthophyta. As a flowering plant containing the anthocyanin of these, they are for example, the Eustoma russellianum group (Eustoma spp), a camellia group (Camellia spp), an azalea group (Rhododendron spp), a carnation group and a peony group (Paeonia spp), the Rosa (Rosa spp), a geranium group (Pelargonium spp), a petunia group (Petunia spp), the Lathyrus group (Lathyrus spp), etc.

[0020]

[Embodiment of the Invention]

All the flower color genotype cross-over designs that the flower color genotype cross-over design of this invention is a genotype breeding method about these anthocyanidins, and can be written by four multiple alleles to hydroxylation of B ring of the precursor compound in a flavonoid biosynthesis are included.

[0021]

It sets to this invention. About precursor compound generation of the petal anthocyanidin biosynthesis of Eustoma russellianum Six sorts of precursor compounds which 1-3 hydroxyl groups of B ring have [the combination of multiple alleles] in HTHF, HTHD, and HO- (it naringenin(s)) eriodictyol, pentahydroxyflavanone, dihydrokaempferol, dihydroquercetin, The 4 various precursor compound in which dihydromyricetin is generated and the hydroxyl group of B ring has one piece and two pieces in HTHF (it naringenin(s)) eriodictyol, dihydrokaempferol, and dihydroquercetin are generated. Two sorts of precursor compounds which have one hydroxyl group of B ring in HFHF (it naringenin(s)) dihydrokaempferol is generated and, in HDHF and HDHD, two sorts of precursor compounds (pentahydroxyflavanone, dihydromyricetin) which have three hydroxyl groups of B ring are generated. Furthermore, anthocyanin Since the locus of Pg/pg in synthase biosynthesis level exists, when a bottom-recessive mold (pgpg) is formed, even if it generates a naringenin (naringenin) and dihydrokaempferol (dihydrokaempferol), finally Pgn is not biosynthesized as a precursor compound. When four sorts of other precursor compounds (eriodictyol, pentahydroxyflavanone, dihydroquercetin, dihydromyricetin) are generated, the biosynthesis of Cyn and the Dpn is carried out as it is.

[0022]

Namely, the allele of HT The biochemical transformation from ERIODIKUTIO-RU (eriodictyol) and dihydrokaempferol (dihydrokaempferol) to [from a naringenin (naringenin)] a dihydroquercetin (dihydroquercetin) is controlled. The allele of HF ERIODIKUTIO-RU From (eriodictyol) to a pentahydroxy flavone (pentahydroxyflavanone) It reaches and is from a dihydroquercetin (dihydroquercetin). The biochemical transformation to dihydromyricetin (dihydromyricetin) is controlled. Therefore, biochemical transformation is not performed if, as for the allele of HF, the precursor compound of ERIODIKUTIO-RU (eriodictyol) or a dihydroquercetin (dihydroquercetin) does not exist. On the other hand, although the allele of HD controls the biochemical transformation from a pentahydroxy flavone (pentahydroxyflavanone) and dihydrokaempferol (dihydrokaempferol) to [from a naringenin (naringenin)] dihydromyricetin (dihydromyricetin), it is the description that this allele changes a substrate into a pentahydroxy flavone (pentahydroxyflavanone) or dihydromyricetin (dihydromyricetin) completely.

[0023]

Therefore, Pgn is not generated even if Pg/pg is a dominant mold (PgPg or Pgpg) in the case of a HDHD mold and a HDHF mold. The allele of HO controls all the biochemical transformation from ERIODIKUTIO-RU (eriodictyol), a pentahydroxy flavone (pentahydroxyflavanone), and dihydrokaempferol (dihydrokaempferol) to [from a naringenin (naringenin)] a dihydroquercetin (dihydroquercetin) and dihydromyricetin (dihydromyricetin). The allele of HO is a regulatory gene which plays a modulatory role to other three allele groups (HT, HF, HD).

[0024]

In this invention, a PgnCynDpn mold can be obtained by the genotype of HTHFPg⁻, and HTHDPg⁻ and HO-Pg⁻ about the petal coloring matter mold of Eustoma russellianum. A PgnCyn mold can be obtained by HTHFPg⁻. A CynDpn mold can be obtained by HTHFPgpg, HTHDPgpg, and HO-pgpg. Pg mold can be obtained by HFHFPg⁻. A Cyn mold can be obtained by HTHFPgpg.

HDHF — and HDHD — it is — and a Dpn mold can be obtained. A white flower can be obtained by HFHFpgpg. A "white flower" points out the thing of the flower which does not contain an anthocyanidin at all here. In addition, a PgnDpn mold is not actually separated once. Moreover, "—" Being written shows that the genotype written before one of them rules over in dominant, and it means that any genotype can be used. Furthermore, it is "again. — " Being written means that any genotype can be used.

[0025]

In this invention, the flower of a purplish red color, red, a purplish red color, a pale red color, and pink can be obtained with a PgnCynDpn mold about the petal coloring matter mold of *Eustoma russellianum*. With a PgnCyn mold, the flower of red, deep red, a pale red color, and pink can be obtained. With a CynDpn mold, the flower of light purple, a purplish red color, purple, and a purple-blue color can be obtained. With a Pgn mold, the flower of red, a pale red color, pink, white red, cream, and white can be obtained. With a Cyn mold, the flower of red, a pale red color, pink, and white red can be obtained. Purple can be obtained with a Dpn mold. A white flower can be obtained with a None mold (genotype of pgpgHFHF).

[0026]

[Example]

From the *Eustoma russellianum* petal, the flower color genotype cross-over design of this invention extracts an anthocyanin using an acetic-acid water solution or 50% acetic-acid methanol 50% (at least 10 to 50%, the concentration of an acetic acid is possible and may use 0.5 – 2 convention hydrochloric acid instead of an acetic acid), carries out hydrochloric-acid hydrolysis of this, and analyzes various anthocyanidins for the hydrolyzate containing an anthocyanidin using high performance chromatography (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) etc. It is the mating approach that a dominant gay mold, a dominant hetero mold, and a bottom-recessive mold can be determined, and more various flower colors than the genotype can be freely created for each flower color about the genotype of the progeny which repeated inbreeding and hybridization and was obtained. Hereafter, although an example explains this invention concretely, this invention is not limited to these examples.

[0027]

[Example 1]

The petal of *Eustoma russellianum* was collected, the part which the petal of all color systems colored was excised, 0.5 – 2 convention hydrochloric-acid water solution (0.5–2N HCl) was added in the test tube after precise weighing, and anthocyanin coloring matter was extracted. It hydrolyzed by heating an extract at 95–100 degrees C after cotton plug filtration and about filtrate. The membrane filter analyzed the solution after the reaction and HPLC equipment analyzed filtrate after filtration.

[0028]

The approach (47 Uddin et al.:J.Japan.Soc.Hort.Sci., 71:40– 2002) given in reference was used for analysis conditions and an analysis apparatus.

[0029]

From HPLC chromatography tea-TO, the peak of three sorts of anthocyanidins, i.e., each anthocyanidin, was computed as an occupancy area, and the total peak area of Pgn, Cyn, and Dpn was made into 100%. About the anthocyanidin, the coloring matter dominant mold (a gay mold or hetero mold) of the flower was identified from the acquired peak.

[0030]

Using three forms (P1 generation) of a Dpn-subject mold, a Cyn-subject mold, and a Pgn-subject mold, the separation of F2 generation by inbreeding was investigated and the result was shown in Table 1. Moreover, similarly, using three forms (P1 generation) of a Dpn-subject mold, a Cyn-subject mold, and a Pgn-subject mold, the separation of F1 generation by reciprocal crossings was investigated, and the result was shown in Table 2. Consequently, the coloring matter mold and genotype of a Dpn-subject mold, a Cyn-subject mold, or a Pgn-subject mold were determined.

[0031]

[Table 1]

P ₁ 世代 (F ₁ 品種)	P ₁ 世代 遺伝型	F ₂ アントシアニ ジンの色素型	観察値 (個体数)	F ₂ 世代 遺伝型	期待値 (分離比)	χ^2 -検定値 *P<0.05	適合値
Cyn-主体型	H ^T H ^F P _g P _g	P _{gn} CynDpn	37	H ^T H ^F P _g -	6	8.838*	0.116
		P _{gn} Cyn	17	H ^T H ^T P _g -	3		
		CynDpn	11	H ^T H ^F P _g P _g	2		
		P _{gn}	10	H ^F H ^F P _g -	3		
		Cyn	1	H ^T H ^T P _g P _g	1		
		none	2	H ^F H ^F P _g P _g	1		
		(78)					
Dpn-主体型	H ^O H ^D P _g P _g	CynDpn	31	H ^O -P _g P _g	3	0.485*	0.468
		Dpn	13 (44)	H ^D H ^D P _g P _g	1		
P _{gn} -主体型	H ^T H ^T P _g P _g	P _{gn} Cyn	96 (96)	H ^T H ^T P _g P _g	1	-	1.000

[0032]

[Table 2]

P ₁ 世代 (F ₁ 品種)	P ₁ 世代 遺伝型	F ₁ アントシアニ ジンの色素型	観察値 (個体数)	F ₁ 世代 遺伝型	期待値 (分離比)	χ^2 -検定値 *P<0.05	適合値
Cyn-主体型 と Dpn-主体型 (正逆交雑)	H ^T H ^F P _g P _g と H ^O H ^D P _g P _g	P _{gn} CynDpn	43	H ^O -P _g - と H ^T H ^D P _g -	3	2.869*	0.238
		CynDpn	44	H ^O -P _g P _g と H ^T H ^D P _g P _g	3		
		Dpn	40 (127)	H ^D H ^F -	2		
Dpn-主体型 と P _{gn} -主体型 (正逆交雑)	H ^O H ^D P _g P _g と H ^T H ^T P _g P _g	P _{gn} CynDpn	173 (173)	H ^O H ^T P _g P _g と H ^D H ^T P _g P _g	1	-	1.000
P _{gn} -主体型 と Cyn-主体型 (正逆交雑)	H ^T H ^T P _g P _g と H ^T H ^F P _g P _g	P _{gn} CynDpn	46	H ^T H ^F P _g -	1	0.011*	0.917
		P _{gn} Cyn	47 (93)	H ^T H ^T P _g -	1		

[0033]

From Table 1 and 2, the Dpn-subject mold form was a HOHDpgpg genotype, and a Cyn-subject mold form is a HTHFPpg genotype and it was shown clearly that a Pgn-subject mold form is a HTHTPgPg genotype. Moreover, about the flower color, the HOHDpgpg genotype of a Dpn-subject mold was a CynDpn mold, and was purple. The HTHFPpg genotype of a Cyn-subject mold was a PgnCynDpn mold, and was a purplish red color. The HTHTPgPg genotype of a Pgn-subject mold was a PgnCyn mold, and was red. In addition, the none mold in Table 1 shows a white flower.

[0034]

The separation of F3 generation by those inbreeding was investigated by having used as the old stock each F two-generation genotype obtained in Table 1, and various F2 lines a coloring

matter mold and a genotype were determined. The result was shown in Table 3.

[0035]

[Table 3]

P ₁ 世代 (F ₂ 系統)	P ₁ 世代 遺伝型	F ₃ アントシアニ ジンの色素型	観察値 (個体数)	F ₃ 世代 遺伝型	期待値 (分離比)	χ^2 -検定値 *p<0.05	適合値
G2D3B27E	H ^T H ^F P ₂ P ₃	CynDpn Cyn none	8 4 2 (14)	H ^T H ^F P ₂ P ₃ H ^T H ^T P ₂ P ₃ H ^F H ^F P ₂ P ₃	2 1 1	0.857*	0.651
G2D3B29A	H ^F H ^F P ₂ P ₃	Pgn none	6 2 (8)	H ^F H ^F P ₂ H ^F H ^F P ₂ P ₃	3 1	0.000*	1.000
G2D3B25F	H ^F H ^F P ₂ P ₃	Pgn	25 (25)	H ^F H ^F P ₂ P ₃	1	-	1.000
G2D3B27Y	H ^T H ^T P ₂ P ₃	Cyn	6 (6)	H ^T H ^T P ₂ P ₃	1	-	1.000
G2D3B26B	H ^F H ^F P ₂ P ₃	none	29 (29)	H ^F H ^F P ₂ P ₃	1	-	1.000
J5A2H16B	H ^O H ^O P ₂ P ₃	CynDpn	10 (10)	H ^O H ^O P ₂ P ₃	1	-	1.000
J5A2H13CZ	H ^O H ^D P ₂ P ₃	CynDpn Dpn	24 12 (36)	H ^O -P ₂ P ₃ H ^D H ^D P ₂ P ₃	3 1	1.333*	0.248
J5A2H110C1A	H ^D H ^D P ₂ P ₃	Dpn	10 (10)	H ^D H ^D P ₂ P ₃	1	-	1.000
W1C3B111Y	H ^T H ^T P ₂ P ₃	PgnCyn	33 (33)	H ^T H ^T P ₂ P ₃	1	-	1.000

[0036]

As shown in Table 3, the G2D3B25F line (flower of white, white red, cream, or pink) was obtained from the HFHFpgPg genotype as a coloring matter mold which has only Pgn coloring matter. As a coloring matter mold which has only Cyn coloring matter, the G2D3B27Y line (flower of white red or pink) was obtained from the HTHTpgpg genotype. It considered as the none mold which does not have coloring matter at all from a HFHFpgpg genotype, and the G2D3B26B line (white flower) was obtained. As a coloring matter mold which has CynDpn coloring matter, the J5A2H16B line (flower of a purplish red color) was obtained from the HOHOpgpg genotype. As a coloring matter mold which has only Dpn coloring matter, the J5A2H110C1A line (purple flower) was obtained from the HDHDpgpg genotype. As a coloring matter mold which has PgnCyn coloring matter, the W1C3B111Y line (red flower) was obtained from the HTHTPgPg genotype. Each of these [be / a pure line strain (dominant or recessive gay mold) / it] is clear.

[0037]

[Example 2]

Hereafter, the mating creating method of F1 seed is explained concretely.

[0038]

The flower (a HTHTpgpg genotype, gay mold) of the color pinks of a Cyn mold single [all] and the flower (a HFHFPGPg genotype, gay mold) of the color whites of a Pgn mold single [all] were crossed, and the flower (a HTHFPgpg genotype, hetero mold) of the color purplish red colors of a PgnCynDpn mold single [all] was obtained.

[0039]

The flower (a HOHOPgpg genotype, gay mold) of the color purplish red colors of a CynDpn mold single [all] and the flower (a HFHFPGPg genotype, gay mold) of the color whites of a Pgn mold single [all] were crossed, and the flower (a HOHFPGpg genotype, hetero mold) of the color purplish red neutral colors of a PgnCynDpn mold single [all] was obtained.

[0040]

The flower (a HTHTPGPg genotype, gay mold) of the color red of a PgnCyn mold single [all] and the flower (a HFHFPGPg genotype, gay mold) of the color whites of a Pgn mold single [all] were crossed, and the flower (a HTHFPgpg genotype, hetero mold) of all the color pink single neutral colors of a PgnCynDpn mold was obtained.

[0041]

[The example 1 of a comparison]

When the reciprocal crossings of the flower of white red were carried out in the flower and Cyn mold of white red with the Pgn mold using the approach (176 nonpatent literature 6, Kana Kobayashi: a thremmatology magazine, 48:169- 1998) supposing genotype, the flower of the purplish red color of a PgnCyn mold was not obtained, instead the flower of the purplish red color of a PgnCynDpn mold was obtained. As for the flower of the purplish red color of a PgnCynDpn mold having dissociated, explanation is not attached in the case where the approach of nonpatent literature 6 is used.

[0042]

[The example 2 of a comparison]

When the reciprocal crossings of a red flower and a red white flower were carried out with the PgnCyn mold using the approach (176 nonpatent literature 6, Kana Kobayashi: a thremmatology magazine, 48:169- 1998) supposing genotype, the red flower was not obtained with a PgnCyn mold, instead the flower of the purplish red color of a PgnCynDpn mold was obtained. As for the flower of the purplish red color of a PgnCynDpn mold having dissociated, explanation is not attached in the case where the approach of nonpatent literature 6 is used.

[0043]

It is clear from these examples that it is the flower color genotype cross-over design the flower color breeding method which belonged the coloring matter mold of Pgn, Cyn, and Dpn excelled [cross-over design] in genotype HXHX-Pg/pg of this invention.

[0044]

[Effect of the Invention]

By this invention, the flower color genotype and coloring matter genotype of *Eustoma russellianum* can be clarified. For example, the outstanding new flower color can be offered using the flower color cross-over design which is flower color genotype HXHX-Pg/pg and belonged the coloring matter mold of Pgn, Cyn, and Dpn.

Moreover, the new flower color which was excellent with the flower color genotype can be offered about other flowering plants. Therefore, a genotype cross-over design practical about new flower color creation of the flowering plant which makes *Eustoma russellianum* the start is offered.

[Translation done.]

全項目

(19)【発行国】日本国特許庁(JP)
 (12)【公報種別】公開特許公報(A)
 (11)【公開番号】特開2004-236516(P2004-236516A)
 (43)【公開日】平成16年8月26日(2004. 8. 26)
 (54)【発明の名称】トルコギキョウの花色遺伝型交配法
 (51)【国際特許分類第7版】

A01H 1/02

【FI】

A01H 1/02

【審査請求】未請求

【請求項の数】3

【出願形態】OL

【全頁数】12

(21)【出願番号】特願2003-26598(P2003-26598)

(22)【出願日】平成15年2月4日(2003. 2. 4)

【新規性喪失の例外の表示】特許法第30条第1項適用申請有り 2002年8月11日～17日 開催
 の「XXVIth International Horticultural Congress」において文書をもって発表

(71)【出願人】

【識別番号】302068210

【氏名又は名称】橋本 文雄

【住所又は居所】鹿児島県鹿児島市唐湊三丁目31-1-2-6

(71)【出願人】

【識別番号】302068209

【氏名又は名称】坂田 祐介

【住所又は居所】鹿児島県鹿児島市谷山中央四丁目4919番地A303

(72)【発明者】

【氏名】橋本 文雄

【住所又は居所】鹿児島市唐湊三丁目31-1-2-6

(72)【発明者】

【氏名】坂田 祐介

【住所又は居所】鹿児島市谷山中央四丁目4919番地A303

【テーマコード(参考)】

2B030

【Fターム(参考)】

2B030 AA02 AB03 AD12 CA01

(57)【要約】

【課題】花色素生合成の遺伝を明らかにし、トルコギキョウの花色遺伝と色素遺伝型を明らかにした上で、トルコギキョウを初めとする花卉の新花色作出について実用的遺伝型交配法を提供するものである。

【解決手段】本発明の花色遺伝型交配法は、花色遺伝型が経路式(I)のフラボノイド生合成に関与し、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ(F3'H)やフラボノイド3'、5'-ヒドロキシラーゼ(F3'、5'H)の遺伝が四つの複対立遺伝子によって制御されているという新しい法則を見出し、結果として、遺伝子組み替え、照射などによる突然変異を起こさせる方法を用いなくても、トルコギキョウの

色素遺伝型からその花色を自由に創成できる、新花色を作出する方法である。〔化1〕
 【選択図】なし

【特許請求の範囲】

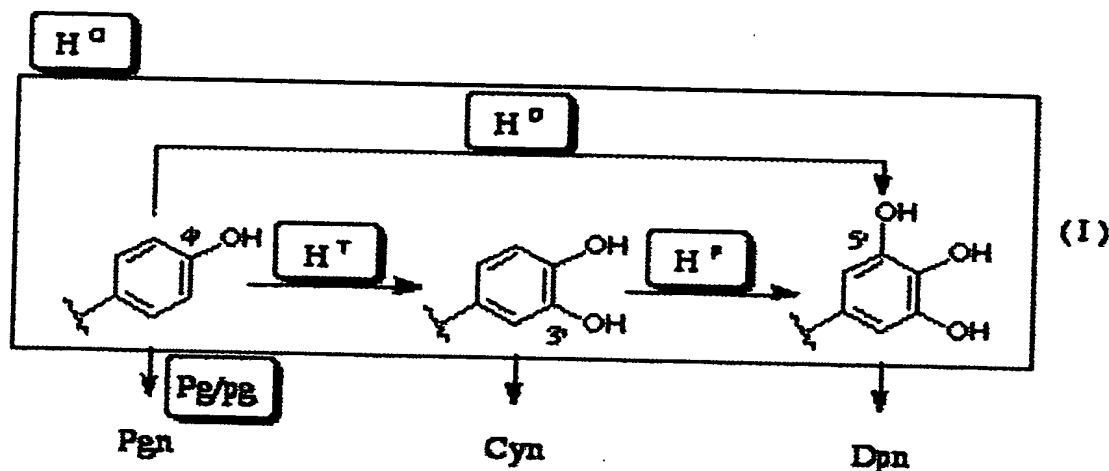
【請求項1】

花卉の花色発現に関わる主要アントシアニン色素のペラルゴニン(Pgn)、シアニン(Cyn)、デルフィニン(Dpn)の遺伝であって、遺伝型 $H^X H^Y \cdot Pg/pg$ を用い、新花色を作出する花色遺伝型交配法。

【請求項2】

花色遺伝型が経路式(I)のフラボノイド生合成に関与し、遺伝する請求項1記載の花色遺伝型交配法。

【化1】



(ここで、 H^T 、 H^F 、 H^D 、 H^O は、フラボノイド生合成の前駆物質でのB環の水酸化に関する複対立遺伝子を表す。 H^T 、 H^F 、 H^D 、 H^O の4つの複対立遺伝子は、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ($F3'H$)とフラボノイド3', 5'-ヒドロキシラーゼ($F3', 5'H$)の、それぞれ3'位の水酸化、5'位の水酸化、3', 5'位の水酸化、および3'位と3', 5'位の水酸化を制御する。この4つの複対立遺伝子の表記方法は、例えば、T、F、D、Oなど他の表記法でもよい。 Pg/pg はPgnの生合成に関するジヒドロフラボノールリダクターゼ(DFR)、あるいはアントシアニンシンターゼ(LDOXまたはAS)の発現に対立する遺伝子座が存在することを示す。)

【請求項3】

花卉の花色がフラボノイド生合成過程で遺伝する請求項1又は請求項2に記載の花色遺伝型交配法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、花色遺伝型を適用したトルコギキョウ(EustomaまたはLisianthus)の新花色育種法に関する。さらに、花色遺伝型を適用した花卉の新花色育種法に関する。

【0002】

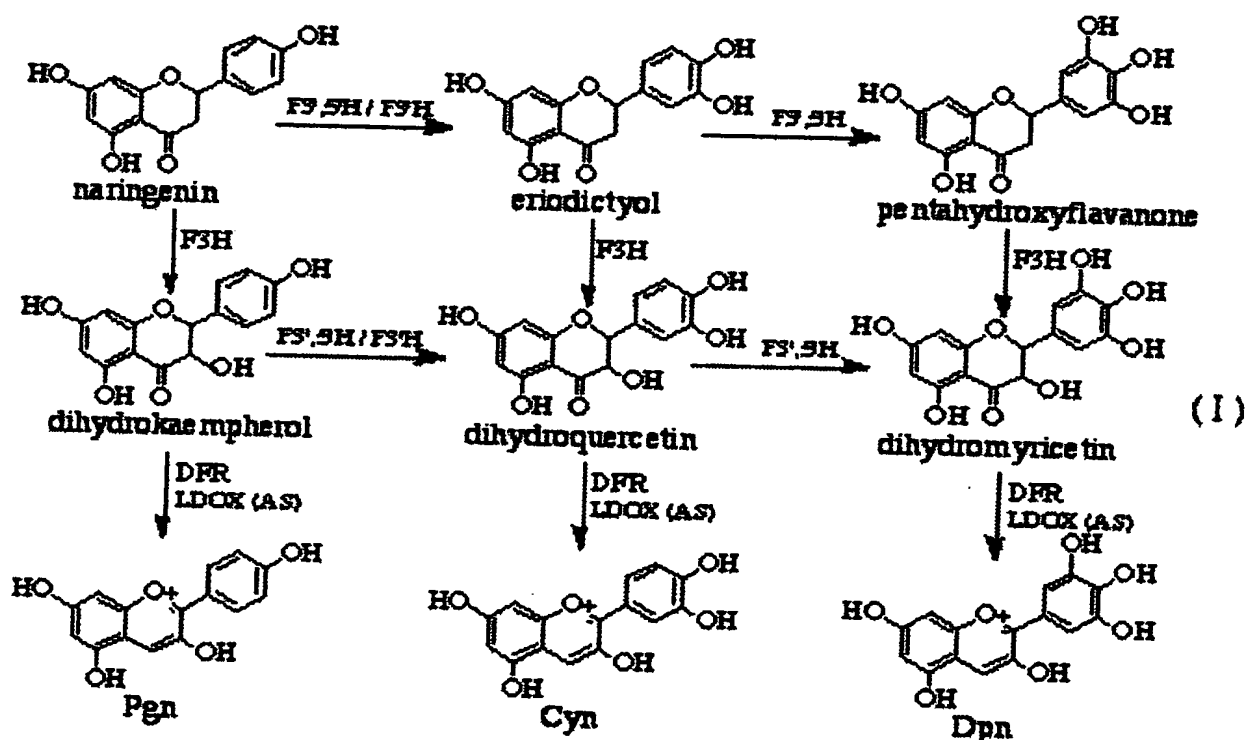
【従来の技術】

アントシアニン類はフラボノイド化合物の一種であり、植物の花、果実、葉などに広く存在し、赤、紫、青などの呈色に関係する色素配糖体である。アントシアニン類を塩酸で加水分解すると、糖部とアグリコン部であるアントシアニンに分解される(非特許文献1、村上孝夫:天然物の構造と

化学、廣川書店、1984年9月:170-172)。

【0003】

アントシアニン類は、植物の花において、フラバノンであるナリンゲニン(naringenin)を出発物質として生合成される。即ち、まずフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ(F3', 5'HまたはF3'H)の作用によりフラバノン骨格のB環に水酸基が更に1個結合したエリオディクテオール(eriodictyol)、更に2個結合したペンタヒドロキシフラバノン(pentahydroxyflavanone)へ酵素変換されることが知られている。また、出発物質であるナリンゲニンが、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ(F3H)の作用を受けジヒドロケンフェロール(dihydrokaempferol)へ酵素変換され、これが基質となって、更にフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼの作用を受け、B環に水酸基が更に1個結合したジヒドロクエルセチン(dihydroquercetin)、更に2個結合したジヒドロミリセチン(dihydromyricetin)へ酵素変換されることが知られている。この3種のジヒドロフラボノール(dihydrokaempferol, dihydroquercetin, dihydromyricetin)がジヒドロフラボノールリダクターゼ(DFR)およびアントシアニンシンターゼ(LDOXまたはAS)の作用を受けて、それぞれペラルゴニン(Pgn)、シアニン(Cyn)、デルフィニン(Dpn)へ酵素変換されることが知られている(非特許文献2、村上孝夫:天然物の構造と化学、廣川書店、1984年9月:155-185)。この一般生合成経路を一般経路式(I)で示す。



【0004】

アントシアニン類は、B環の水酸基が異なることでその呈色が決定される。例えば、一般に花色素で化学構造中、B環の4'位に水酸基が一個有るものはペラルゴニン(Pgn)でオレンジ色～朱赤色を呈し、B環の3', 4'位に水酸基が二個有るものはシアニン(Cyn)で赤色～深紅色を呈し、B環の3', 4', 5'位に水酸基が三個有るものはデルフィニン(Dpn)で赤紫色～紫色を呈し、これらが共存することによって様々な花色を発現する(非特許文献3、本多利雄他:現代化学、1998年5月:25-32)。

【0005】

これらの他、種々のアシル基の結合したアントシアニン類も多数報告され、これらが分子間で互いにスタッキングして花色が変調する現象(分子間自己会合作用)、他の黄色フラボノイド類とサンドイッチ状にスタッキングして花色が変調(青色化)する現象(分子間コピグメント作用)、金属原子と結合することによって花色が変調(青色化)する現象(金属錯体イオン形成作用)、分子中のアシ

ル基等が分子内でスタッキングして花色が変調(青色化)する現象(分子内コピグメント作用)、並びに細胞液胞内pHが変化する現象などで花色が決定されることが認められている(非特許文献4、Goto, T. et al. : Angew. Chem. Int. Ed. Engl. , 30:17-33, 1991)。

【0006】

植物の花色遺伝は、花色自体(赤、青、黄、紫など)を遺伝子型として捉えたものが多く報告されている(非特許文献5、安田 齊:花色の生理・生化学、内田老鶴園:pp 219-272)。近年、フラボノイド色素に関する花色遺伝型の解析が試みられているが、これらはビール(Beale, 1945)の唱えた1遺伝子1酵素説に基づくものである。その例として、ゼラニウム花卉のアントシアニン生合成における、ジヒドロフラボノールリダクターゼ(DFR)およびアントシアニンシンターゼ(LDOXまたはAS)の酵素系をそれぞれ E_1/e_1 および E_2/e_2 と表記し、遺伝子型を想定した方法がある(非特許文献6、小林加奈:育種学雑誌、48:169-176, 1998)。

【0007】

また、ペチュニアの花では、 Ht_1 と Ht_2 の2遺伝子がフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ($F3'H$)を、 Hf_1 と Hf_2 の2遺伝子がフラボノイド3'、5'-ヒドロキシラーゼ($F3'$ 、5' H)を制御すると報告されている(非特許文献7、Holton, T. A. et al. : The Plant Cell, 7:1071-1083, 1995)。

【0008】

更に、ペチュニアの花では、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ($F3'H$)とフラボノイド3'、5'-ヒドロキシラーゼ($F3'$ 、5' H)のB環の水酸化が二遺伝子支配を受けているとの記載がある(非特許文献8、Holton, T. A. et al. : Nature, 366:276-279)。本発明による花色遺伝型交配法では、一遺伝子の支配下にある四つの複対立遺伝子で花色が制御されていることが特徴で、トルコギキョウの花色色素遺伝は、二遺伝子支配としては同定できなかった。

【0009】

更にまた、ペチュニアの花では、遺伝子レベルでそれぞれの2遺伝子座が(Ht_1 、 Ht_2 はフラボノイドB環の3'位の水酸化に関与し、 Hf_1 、 Hf_2 はフラボノイドB環の5'位の水酸化に)関与する事実を明らかにしたものの、色素遺伝型として後代にどのような花色が遺伝するのか、必ずしも色素遺伝型と花色の遺伝に相関性が認められなかったなどの問題点がある(非特許文献9、Griesbach, R. J. : J. Heredit. , 87:241-245, 1996)。

【0010】

その他、特開平5-184370号(以下、特許文献1という)に、フラボノイド水酸化酵素遺伝子(特許文献1の第0001~0002段落)の記載がある。「フラボノイド3'、5'-水酸化酵素活性を持つタンパク質をコードしているDNA鎖またはこのDNA鎖の任意の断片が提供される。このDNA鎖を目的植物に導入することにより、新しい色彩を有した品種を作出することができる。また本発明は、上記のDNA鎖またはこのDNA鎖の任意の断片を含有している組換えベクターにも関する」という記載がある(特許文献1の第0004段落)。特開平10-113184号(以下、特許文献2という)には、フラボノイド配糖化酵素遺伝子(特許文献2の第0001~0008段落)の記載がある。「リンドウの花弁よりUDP-グルコース:フラボノイド3, 5-O-グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子を単離し、その配列決定をすることに成功し」、「ゲンチオデルフィン生合成遺伝子のうち、3位、5位の2位を配糖化する糖転移酵素遺伝子を提供することにある。」という記載がある(特許文献2の第0005段落)。

特開平11-509733号(以下、特許文献3という)には、植物における遺伝子発現調節のための組成物及び方法に関する特許請求の範囲1~15の記載がある。

【0011】

【特許文献1】

特開平5-184370号公報(第2頁、第14頁、図2)

【特許文献2】

特開平10-113184号公報(第2頁)

【特許文献3】

特開平11-509733号公報(第2頁)

【非特許文献1】

村上孝夫、「アントシアニン誘導体」、天然物の構造と化学、廣川書店、1984年9月、P. 170-172。

【非特許文献2】

村上孝夫、「フラボノイド」、天然物の構造と化学、廣川書店、1984年9月、P. 155-185。

【非特許文献3】

本多利雄と斉藤規夫、「花の色の科学」、現代化学、東京化学同人、1998年5月、P. 25-32。

【非特許文献4】

Goto, T. とKondo, T. ,「Structure and Molecular Stacking of Anthocyanins— Flower Color Variation」, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. , 1991年、第30巻、P. 17-33。

【非特許文献5】

安田 齊、「花色の遺伝生化学」、花色の生理・生化学、内田老鶴圃、1993年3月、P. 219-272。

【非特許文献6】

小林加奈、他2名、「ゼラニウムにおける紫色花作出のための遺伝様式の解明」、育種学雑誌、1998年、第48巻、P. 169-176。

【非特許文献7】

Holton, T. A. とCornish, E. C. ,「Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis」, The Plant Cell, 1995年、第7巻、P. 1071-1083。

【非特許文献8】

Holton, T. A. , 他9名、「Cloning and Expression of Cytochrome P450 Genes Controlling Flower Colour」, Nature, 1993年、第366巻、P. 276-279。

【非特許文献9】

Griesbach, R. J. ,「The Inheritance of Flower Color in *Petunia hybrida* Vilm」, J. Heredit. , 1996年、第87巻、P. 241-245。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、花色自体の遺伝子型育種法では後代花色の分離に曖昧なところが多く、実用化することに沢山の問題点を残した。また、非特許文献6に記載のある、 E_1/e_1 および E_2/e_2 で表されたゼラニウム花色素の遺伝についても、後代の分離比に疑問点があり、実用化には至らなかった。特許文献においては、遺伝子組み替え、照射などによる突然変異を起こさなければ、新花色を作出することができないという問題がある。

【0013】

本発明は、花色素生合成の遺伝を明らかにし、トルコギキョウの花色素遺伝と色素遺伝型を明らかにした上で、トルコギキョウを初めとする花卉の新花色作出について実用的遺伝型交配法を提供するものである。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決するために、フラボノイド生合成のB環の水酸化に関するフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ(F3'H)やフラボノイド3', 5'-ヒドロキシラーゼ(F3', 5'H)、などの遺伝に着目し、その遺伝の分離を調べた結果、ペラルゴニン生合成に関与するジヒドロフラボノールリダクターゼ(DFR)およびアントシアニンシンターゼ(LDOX またはAS)の酵素系の遺伝がPg/pgの優性/劣性の遺伝子によって制御されていることと併せて、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ(F3'H)やフラボノイド3', 5'-ヒドロキシラーゼ(F3', 5'H)の遺伝が四つの複対立遺伝子によって制御されているという新しい法則を見出し、結果として、遺伝子組み替え、照射などによる突然変異を起こさせる方法を用いなくても、トルコギキョウの色素遺伝型からその花色を自由に創成できる。すなわち、

【0015】

本発明は、トルコギキョウの主要花色素である、3つのアントシアニン：ペラルゴニン(Pgn)、シアニン(Cyn)、デルフィニン(Dpn)の遺伝に着目し、自殖や正逆交雑を行い検討した結果、 $F_1 \sim F_3$ 世代の色素表現型の分離から、遺伝の新しい法則を見出した。また、PgnとDpn色素型について、PgnとDpn色素は共存せず、両者はそれぞれ単独型として認められるか、または、Cyn色素を伴うことで遺伝することを見出した。後代実生の分離とカイニ乗検定の結果、Pgn色素の遺伝にはフラボノイド生合成におけるアントシアニン生合成レベルでPg/pgとして示される遺伝子座が存在することを見出した。また、色素前駆体のB環の水酸化に関与するフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ(F3'H)とフラボノイド3', 5'-ヒドロキシラーゼ(F3', 5'H)の酵素反応系には、 H^T 、 H^F 、 H^D 、 H^O の4つの複対立遺伝子が存在し、これらが3'位の水酸化、5'位の

水酸化、3'、5' 位の水酸化、および3' 位と3'、5' 位の水酸化を制御し、これらの組合せによって花色表現型が決定されることを見出し、本発明を完成した。

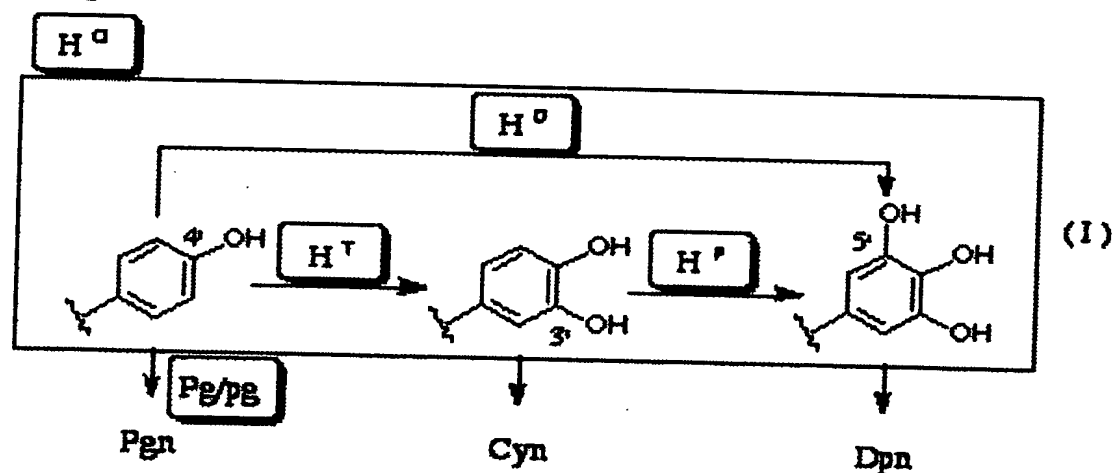
【0016】

本発明の花色遺伝型交配法は、花卉の花色発現に関わる主要アントシアニン色素のペラルゴニン(Pgn)、シアニン(Cyn)、デルフィニン(Dpn)の遺伝であって、遺伝型 $H^X H^X \cdot Pg/pg$ を用い、新花色を作出するものである。例えば、トルコギキョウ花卉の、花色発現に関わる主要アントシアニン色素のペラルゴニン(Pgn)、シアニン(Cyn)、デルフィニン(Dpn)の遺伝について、Pgn色素の遺伝子座をPg/pgとして示し、フラボノイド色素前駆体のB環の水酸化に関与するフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ(F3'H)とフラボノイド3'、5'-ヒドロキシラーゼ(F3'、5'H)の酵素反応系の遺伝型を、 H^T 、 H^F 、 H^D 、 H^O の4つの複対立遺伝子で示し、Pg/pgの記号の内二つを選択し(PgPg、Pgpg、pgpgの組合せ記号の内一つを選択し)、また、 H^T 、 H^F 、 H^D 、 H^O の記号の内二つを選択し($H^T H^T$ 、 $H^T H^F$ 、 $H^T H^D$ 、 $H^T H^O$ 、 $H^F H^F$ 、 $H^D H^F$ 、 $H^O H^F$ 、 $H^D H^D$ 、 $H^D H^O$ 、 $H^O H^O$ の組合せ記号の内一つを選択し)、遺伝型 $H^X H^X \cdot Pg/pg$ である方法を用いた新花色を育種する花色遺伝型交配法である。

【0017】

本発明の花色遺伝型交配法は、花色遺伝型が経路式(I)のフラボノイド生合成に関与し、遺伝するものも含まれる。

【化3】



ここで、 H^T 、 H^F 、 H^D 、 H^O は、フラボノイド生合成の前駆物質でのB環の水酸化に関する複対立遺伝子を表す。 H^T 、 H^F 、 H^D 、 H^O の4つの複対立遺伝子は、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ(F3'H)とフラボノイド3'、5'-ヒドロキシラーゼ(F3'、5'H)の、それぞれ3' 位の水酸化、5' 位の水酸化、および3' 位と3'、5' 位の水酸化を制御する。この4つの複対立遺伝子の表記方法は、例えば、T、F、D、Oなど他の表記法でもよい。Pg/pgはPgnの生合成に関与するジヒドロフラボノールリダクターゼ(DFR)、あるいはアントシアニンシンターゼ(LDOXまたはAS)の発現に対立する遺伝子座が存在することを示す。

【0018】

本発明の花色遺伝型交配法は、花卉の花色がフラボノイド生合成過程で遺伝するものに適用することができる。

【0019】

本発明の花卉とは、フラボノイドを含む花を有する被子植物であり、被子植物として双子葉植物、単子葉植物に関する。これらのうちのアントシアニンを含む花卉として、例えば、トルコギキョウ属(Eustoma spp)、ツバキ属(Camellia spp)、ツツジ属(Rhododendron spp)、ボタン属とシャクヤク属(Paeonia spp)、バラ属(Rosa spp)、ゼラニウム属(Pelargonium spp)、ペチュニア属(Petunia spp)、レンリソウ属(Lathyrus spp)などである。

【0020】

【発明の実施の形態】

本発明の花色遺伝型交配法とは、該アントシアニン類に関する遺伝型育種法であって、かつフラボノイド生合成における前駆化合物のB環の水酸化に四つの複対立遺伝子で表記することのできる花色素遺伝型交配法を全て含む。

【0021】

本発明において、例えば、トルコギキョウの花弁アントシアニン生合成の前駆化合物生成について、複対立遺伝子の組合せが、 $H^T H^F$ 、 $H^T H^D$ と H^O —の場合、B環の水酸基が1～3個有する六種の前駆化合物(naringenin、eriodictyol、pentahydroxyflavanone、dihydrokaempferol、dihydroquercetin、dihydromyricetin)を生成し、 $H^T H^T$ の場合、B環の水酸基が1個と2個を有する四種類の前駆化合物(naringenin、eriodictyol、dihydrokaempferol、dihydroquercetin)を生成し、 $H^F H^F$ の場合、B環の水酸基を1個有する二種の前駆化合物(naringenin、dihydrokaempferol)を生成し、 $H^D H^F$ と $H^D H^D$ の場合、B環の水酸基を3個有する二種の前駆化合物(pentahydroxyflavanone、dihydromyricetin)を生成する。更に、anthocyanin synthase生合成レベルにあるPg/pgの遺伝子座が存在するため、劣性ホモ型(pgp)を形成した場合には、前駆化合物として、ナリンゲニン(naringenin)およびジヒドロケンフェロール(dihydrokaempferol)を生成しても、Pgnを最終的には生合成しない。他の四種の前駆化合物(eriodictyol、pentahydroxyflavanone、dihydroquercetin、dihydromyricetin)を生成した場合には、CynおよびDpnがそのまま生合成される。

【0022】

すなわち、 H^T の対立遺伝子は、ナリンゲニン(naringenin)からエリオディクティオール(eriodictyol)およびジヒドロケンフェロール(dihydrokaempferol)からジヒドロクエルセチン(dihydroquercetin)への生化学的変換を制御し、 H^F の対立遺伝子は、エリオディクティオール(eriodictyol)からペンタヒドロキシフラボン(pentahydroxyflavanone)およびジヒドロクエルセチン(dihydroquercetin)からジヒドロミリセチン(dihydromyricetin)への生化学的変換を制御する。従って、 H^F の対立遺伝子は、エリオディクティオール(eriodictyol)やジヒドロクエルセチン(dihydroquercetin)の前駆化合物が存在しなければ生化学的変換は行われない。一方、 H^D の対立遺伝子は、ナリンゲニン(naringenin)からペンタヒドロキシフラボン(pentahydroxyflavanone)およびジヒドロケンフェロール(dihydrokaempferol)からジヒドロミリセチン(dihydromyricetin)への生化学的変換を制御するが、この対立遺伝子は、基質を完全にペンタヒドロキシフラボン(pentahydroxyflavanone)またはジヒドロミリセチン(dihydromyricetin)へ変換することが特徴である。

【0023】

従って、 $H^D H^D$ 型と $H^D H^F$ 型の場合、Pg/pgが優性型(PgPgまたはPgpg)であっても、Pgnは生成されない。 H^O の対立遺伝子は、ナリンゲニン(naringenin)からエリオディクティオール(eriodictyol)とペンタヒドロキシフラボン(pentahydroxyflavanone)およびジヒドロケンフェロール(dihydrokaempferol)からジヒドロクエルセチン(dihydroquercetin)とジヒドロミリセチン(dihydromyricetin)への全ての生化学的変換を制御する。 H^O の対立遺伝子は、他の三つの対立遺伝子群(H^T 、 H^F 、 H^D)に対して、調節的な役割を演じる調節遺伝子である。

【0024】

本発明において、例えば、トルコギキョウの花弁色素型について、 $H^T H^F$ Pg—、 $H^T H^D$ Pg—と H^O —Pg—の遺伝型でPgnCynDpn型を得ることができる。 $H^T H^T$ Pg—でPgnCyn型を得ることができる。 $H^T H^F$ pgpg、 $H^T H^D$ pgpgと H^O —pgpgでCynDpn型を得ることができる。 $H^F H^F$ Pg—でPg型を得ることができる。 $H^T H^T$ pgpgでCyn型を得ることができる。 $H^D H^F$ —と $H^D H^D$ —でDpn型を得ることができる。 $H^F H^F$ pgpgで白花を得ることができる。ここで「白花」とは、アントシアニンを全く含まない花のことを指す。なお、PgnDpn型は、実際に一度も分離しない。また、「—」と表記されているのは、その一つ前に表記された遺伝型に優性的に支配されていることを示し、いずれの遺伝型でも用いることができることを意味する。更にまた、「—」と表記されているのは、いずれの遺伝型も用いることができることを意味する。

【0025】

本発明において、例えば、トルコギキョウの花弁色素型について、PgnCynDpn型で、赤紫色、赤色、紫赤色、淡赤色、ピンク色の花を得ることができる。PgnCyn型で、赤色、深赤色、淡赤色、ピンク色の花を得ることができる。CynDpn型で、淡紫色、紫赤色、紫色、青紫色の花を得ることが

できる。Pgn型で、赤色、淡赤色、ピンク色、白赤色、クリーム色、白色の花を得ることができる。Cyn型で、赤色、淡赤色、ピンク色、白赤色の花を得ることができる。Dpn型で、紫色を得ることができる。None型(pgp^Hpg^HF^HF^Hの遺伝型)で白花を得ることができる。

【0026】

【実施例】

本発明の花色遺伝型交配法は、トルコギキョウ花卉から、50%酢酸水溶液、または50%酢酸メタノールを用いてアントシアニンを抽出し(酢酸の濃度は10~50%でも可能で、酢酸の代わりに0.5~2規定塩酸を用いても良い)、これを塩酸加水分解して、アントシアニンを含む加水分解物を高速液体クロマトグラフィー(High Performance Liquid Chromatography、HPLC)などを用いて各種アントシアニンを分析する。自殖や交雑を繰り返して得られた後代の遺伝型について、優性ホモ型、優性ヘテロ型、劣性ホモ型を決定し、各花色をその遺伝型より様々な花色を自由自在に作出することのできる交配方法である。以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

【0027】

【実施例1】

トルコギキョウの花弁を採集し、全色系の花弁の着色した部分を切除し、精秤後、試験管中にて0.5~2規定塩酸水溶液(0.5~2N HCl)を加え、アントシアニン色素を抽出した。抽出液を綿栓濾過後、濾液について95~100℃で加熱し加水分解を行った。反応後、溶液をメンブランフィルターで濾過後、濾液をHPLC装置にて分析した。

【0028】

分析条件および分析装置は、文献記載の方法(Uddin et al. : J. Japan. Soc. Hort. Sci.、71:40-47、2002)を用いた。

【0029】

HPLCクロマトチャートから、3種のアントシアニン、すなわち、それぞれのアントシアニンのピークを占有面積として算出し、Pgn、Cyn、Dpnの全ピーク面積を100%とした。得られたピークからアントシアニンについて、その花の色素優性型(ホモ型またはヘテロ型)を同定した。

【0030】

Dpn-主体型、Cyn-主体型およびPgn-主体型の3品種(P₁世代)を用いて、自殖によるF₂世代の分離を調べ、その結果を表1に示した。また同様に、Dpn-主体型、Cyn-主体型およびPgn-主体型の3品種(P₁世代)を用いて、正逆交雑によるF₁世代の分離を調べ、その結果を表2に示した。その結果、Dpn-主体型、Cyn-主体型またはPgn-主体型の、色素型および遺伝型を決定した。

【0031】

【表1】

P ₁ 世代 (P ₁ 品種)	P ₁ 世代 遺伝型	F ₂ アントシアニ ジンの色素型	観察値 (個体数)	F ₂ 世代 遺伝型	期待値 (分離比)	χ ² -検定値 *P<0.05	適合値
Cyn-主体型	H ^T H ^F P ₂ P ₂	PgnCynDpn PgnCyn CynDpn Pgn Cyn none	37 17 11 10 1 2 (78)	H ^T H ^F P ₂ H ^T H ^T P ₂ H ^T H ^F P ₂ P ₂ H ^F H ^F P ₂ H ^T H ^T P ₂ P ₂ H ^F H ^F P ₂ P ₂	6 3 2 3 1 1	8.838*	0.116
Dpn-主体型	H ^O H ^D P ₂ P ₂	CynDpn Dpn	31 13 (44)	H ^O -P ₂ P ₂ H ^D H ^D P ₂ P ₂	3 1	0.485*	0.468
Pgn-主体型	H ^T H ^T P ₂ P ₂	PgnCyn	96 (96)	H ^T H ^T P ₂ P ₂	1	-	1.000

【0032】

【表2】

P ₁ 世代 (F ₁ 品種)	P ₁ 世代 遺伝型	F ₁ アントシアニ ジンの色素型	観察値 (個体数)	F ₁ 世代 遺伝型	期待値 (分離比)	χ^2 -検定値 *P<0.05	適合値
Cyn-主体型 と Dpn-主体型 (正逆交雑)	$H^T H^F P_{Pg} P_{Pg}$ と $H^O H^D P_{Pg} P_{Pg}$	PgnCynDpn	43	$H^O \cdot P_{Pg}$ と $H^T H^D P_{Pg}$	3	2.869*	0.238
		CynDpn	44	$H^O \cdot P_{Pg}$ と $H^T H^D P_{Pg}$	3		
		Dpn	40 (127)	$H^D H^F$	2		
Dpn-主体型 と Pgn-主体型 (正逆交雑)	$H^O H^D P_{Pg} P_{Pg}$ と $H^T H^T P_{Pg} P_{Pg}$	PgnCynDpn	173 (173)	$H^O H^T P_{Pg}$ と $H^D H^T P_{Pg}$	1	0.011*	1.000
Pgn-主体型 と Cyn-主体型 (正逆交雑)	$H^T H^T P_{Pg} P_{Pg}$ と $H^T H^F P_{Pg} P_{Pg}$	PgnCynDpn	46	$H^T H^F P_{Pg}$	1		
		PgnCyn	47 (93)	$H^T H^T P_{Pg}$	1		

【0033】

表1および表2から、Dpn-主体型品種は $H^O H^D pgpg$ 遺伝型であり、Cyn-主体型品種は $H^T H^F Ppgpg$ 遺伝型であり、Pgn-主体型品種は $H^T H^T PpgPg$ 遺伝型であることを明らかにした。また、花色について、Dpn-主体型の $H^O H^D pgpg$ 遺伝型はCynDpn型であって、紫色であった。Cyn-主体型の $H^T H^F Ppgpg$ 遺伝型はPgnCynDpn型であって、赤紫色であった。Pgn-主体型の $H^T H^T PpgPg$ 遺伝型はPgnCyn型であって、赤色であった。なお表1中none型は白花を示す。

【0034】

表1で得られた各F₂世代遺伝型を親株として、それらの自殖によるF₃世代の分離を調べ、各種F₂系統の色素型と遺伝型とを決定した。その結果を表3に示した。

【0035】

【表3】

P ₁ 世代 (F ₂ 系統)	P ₁ 世代 遺伝型	F ₂ アントシアニ ジンの色素型	観察値 (個体数)	F ₂ 世代 遺伝型	期待値 (分離比)	χ^2 -検定値 *P<0.05	適合値
G2D3B27E	H ^T H ^F PgPg	CynDpn Cyn none (14)	8 4 2	H ^T H ^F PgPg H ^T H ^T PgPg H ^F H ^F PgPg	2 1 1	0.857*	0.651
G2D3B29A	H ^F H ^F PgPg	Pgn none (8)	6 2	H ^F H ^F PgPg H ^F H ^F PgPg	3 1	0.000*	1.000
G2D3B25F	H ^F H ^F PgPg	Pgn (25)	25	H ^F H ^F PgPg	1	-	1.000
G2D3B27Y	H ^T H ^T PgPg	Cyn (6)	6	H ^T H ^T PgPg	1	-	1.000
G2D3B26B	H ^F H ^F PgPg	none (29)	29	H ^F H ^F PgPg	1	-	1.000
J5A2H16B	H ^O H ^O PgPg	CynDpn (10)	10	H ^O H ^O PgPg	1	-	1.000
J5A2H13CE	H ^O H ^D PgPg	CynDpn Dpn (36)	24 12	H ^O -PgPg H ^D H ^D PgPg	3 1	1.333*	0.248
J5A2H110C1A	H ^D H ^D PgPg	Dpn (10)	10	H ^D H ^D PgPg	1	-	1.000
W1C3B111Y	H ^T H ^T PgPg	PgnCyn (33)	33	H ^T H ^T PgPg	1	-	1.000

【0036】

表3から分かるように、H^FH^FPgPg遺伝型からPgn色素のみを有する色素型として、G2D3B25F系統(白色、白赤色、クリーム色、またはピンク色の花)を得た。H^TH^Tpgpg遺伝型からCyn色素のみを有する色素型として、G2D3B27Y系統(白赤色、またはピンク色の花)を得た。H^FH^Fpgpg遺伝型から色素を全く有しないnone型として、G2D3B26B系統(白花)を得た。H^OH^Opgpg遺伝型からCynDpn色素を有する色素型として、J5A2H16B系統(赤紫色の花)を得た。H^DH^Dpgpg遺伝型からDpn色素のみを有する色素型として、J5A2H110C1A系統(紫色の花)を得た。H^TH^TPgPg遺伝型からPgnCyn色素を有する色素型として、W1C3B111Y系統(赤色の花)を得た。これらは、いずれも純系(優性または劣性のホモ型)であることは明らかである。

【0037】

【実施例2】

以下、F₁種子の交配作出法を具体的に説明する。

【0038】

Cyn型の一重全色ピンク色の花(H^TH^Tpgpg遺伝型、ホモ型)とPgn型の一重全色白色の花(H^FH^FPgPg遺伝型、ホモ型)を交配し、PgnCynDpn型の一重全色赤紫色の花(H^TH^FPgpg遺伝

型、ヘテロ型)を得た。

【0039】

CynDpn型の一重全色赤紫色の花($H^O H^O pgpg$ 遺伝型、ホモ型)とPgn型の一重全色白色の花($H^F H^F PgPg$ 遺伝型、ホモ型)を交配し、PgnCynDpn型の一重全色赤紫中間色の花($H^O H^F Pgpg$ 遺伝型、ヘテロ型)を得た。

【0040】

PgnCyn型の一重全色赤色の花($H^T H^T PgPg$ 遺伝型、ホモ型)とPgn型の一重全色白色の花($H^F H^F PgPg$ 遺伝型、ホモ型)を交配し、PgnCynDpn型の一重全色ピンク中間色の花($H^T H^F Pgpg$ 遺伝型、ヘテロ型)を得た。

【0041】

〔比較例1〕

遺伝子型を想定した方法(非特許文献6、小林加奈:育種学雑誌、48:169-176、1998)を用いて、Pgn型で白赤色の花とCyn型で白赤色の花を正逆交雑したところ、PgnCyn型の赤紫色の花は得られず、その代わりにPgnCynDpn型の赤紫色の花が得られた。非特許文献6の方法を用いた場合では、PgnCynDpn型の赤紫色の花が分離したことは説明が付かない。

【0042】

〔比較例2〕

遺伝子型を想定した方法(非特許文献6、小林加奈:育種学雑誌、48:169-176、1998)を用いて、PgnCyn型で赤色の花と白花を正逆交雑したところ、PgnCyn型で赤色の花は得られず、その代わりにPgnCynDpn型の赤紫色の花が得られた。非特許文献6の方法を用いた場合では、PgnCynDpn型の赤紫色の花が分離したことは説明が付かない。

【0043】

これらの実施例から、本発明の遺伝型 $H^X H^X \cdot Pg/pg$ でPgn、Cyn、Dpnの色素型を帰属した花色育種法が優れた花色遺伝型交配法であることは明らかである。

【0044】

【発明の効果】

本発明により、トルコギキョウの花色遺伝型と色素遺伝型を明らかにできる。たとえば、花色遺伝型 $H^X H^X \cdot Pg/pg$ であってPgn、Cyn、Dpnの色素型を帰属した花色交配法を用いて、優れた新花色を提供できる。

また、他の花卉についても、花色遺伝型により優れた新花色を提供できる。従って、トルコギキョウを初めとする花卉の新花色作出について実用的な遺伝型交配法を提供するものである。

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2004-236516

(43)Date of publication of application : 26.08.2004

(51)Int.Cl.

A01H 1/02

(21)Application number : 2003-026598

(71)Applicant : HASHIMOTO FUMIO
SAKATA YUSUKE

(22)Date of filing : 04.02.2003

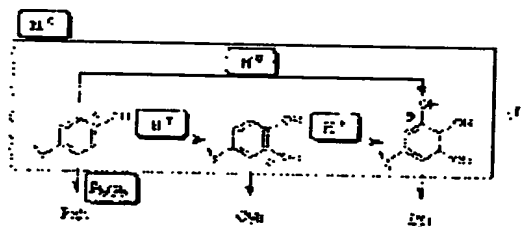
(72)Inventor : HASHIMOTO FUMIO
SAKATA YUSUKE

(54) METHOD FOR FLOWER COLOR GENOTYPE CROSSING OF EUSTOMA OR LISIANTHUS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To elucidate inheritance of flower pigment biosynthesis and elucidate the flower color inheritance and pigment genotype of Eustoma or Lisianthus, and further to provide a practical method for genotype crossing for creating a new flower color of petals including the Eustoma or Lisianthus.

SOLUTION: This method for flower color genotype crossing comprises the following. A new law that the flower color genotype is involved in flavonoid biosynthesis of a pathway formula (I) and inheritance of flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) or flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3',5'H) is controlled with four multiple alleles is found out. From the results, the flower color can freely be created from the pigment genotype of the Eustoma or Lisianthus even without using a method for causing mutation by genetic recombination, irradiation, or the like. Thereby, the new flower color can be created.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

12.11.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]